



REC'D 28 DEC 2004  
WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 OCT. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété Industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

#### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)

BEST AVAILABLE COPY

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W /260899

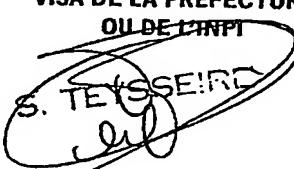
REMIS DES PIÈCES DATE 22 OCT 2003 LIEU 69 INPI LYON		Bérever à l'INPI <b>1</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE RHODIA SERVICES Direction de la Propriété Industrielle Centre de Recherche de Lyon BP 62 69192 SAINT-FONS CEDEX	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		0312329 22 OCT. 2003	
Vos références pour ce dossier (facultatif) R 03137			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2</b> NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/>			
Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/>			
Demande divisionnaire <input type="checkbox"/>			
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date / / /
		N°	Date / / /
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		N°	Date / / /
<b>3</b> TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
Procédé de fabrication de composé comprenant un groupement hydroxyle libre et un groupement hydroxyle protégé par une fonction ester par réaction enzymatique			
<b>4</b> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date / / / N° Pays ou organisation Date / / / N° Pays ou organisation Date / / / N°	
<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			
<b>5</b> DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		RHODIA CHIMIE	
Prénoms			
Forme juridique		SA	
N° SIREN		1 . . . . . . .	
Code APE-NAF		1 . . . .	
Adresse	Rue	26, quai Alphonse le Gallo	
	Code postal et ville	92512	BOULOGNE BILLANCOURT CEDEX
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

BREVET D'INVENTION  
 CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISSION DES PIÈCES	Réervé à l'INPI
OCT 2003	
DATE	69 INPI LYON
LIEU	0312329
N° D'ENREGISTREMENT	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

08 540 W /260899

<b>6 MANDATAIRE</b>			
Nom ESSON			
Prénom Jean-Pierre			
Cabinet ou Société RHODIA SERVICES			
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel 11 février 1998			
Adresse	Rue	Direction de la Propriété Industrielle Centre de Recherche de Lyon BP 62	
	Code postal et ville	69192	SAINT-FONS CEDEX
N° de téléphone (facultatif)		04.72.89.69.52	
N° de télécopie (facultatif)		04.72.89.69.68	
Adresse électronique (facultatif)			
<b>7 INVENTEUR (S)</b>			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques	
		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques	
		<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OIL DE L'INPI</b> 	
Jean-Pierre ESSON 			

Procédé de fabrication de composé comprenant un groupement hydroxyle libre et  
un groupement hydroxyle protégé par une fonction ester  
par réaction enzymatique

5

La présente invention concerne un procédé de fabrication d'un composé comprenant un groupement hydroxyle libre et un groupement hydroxyle protégé par une fonction ester par réaction enzymatique en utilisant une lipase de la 10 classe EC 3.1.1.3. La présente invention concerne également l'utilisation de ce composé comme intermédiaire pour la fabrication de médicaments et de produits pharmaceutiques.

Les synthons chiraux comprenant un groupement hydroxyle libre et un groupement hydroxyle protégé par une fonction ester sont particulièrement 15 intéressants pour la synthèse asymétrique de produits pharmaceutiques. Ainsi, les synthons chiraux du type 1-acétoxy-4-hydroxycyclopent-1-ène sont particulièrement utilisés comme précurseur des prostaglandines, des prostacyclines et des thromboxanes.

Il existe notamment dans l'art antérieur plusieurs procédés développés pour la 20 préparation de composés monoacétate S et/ou R énantiomériquement purs par catalyse enzymatique de la réaction de monoacylation par des enzymes d'origine animale principalement. Par exemple, la pancréatine, une enzyme provenant de pancréas du porc, catalyse la réaction de monoacétylation du 1,4-dihydroxycyclopent-2-ène pour la fabrication de composés monoacétate S 25 énantiomériquement purs.

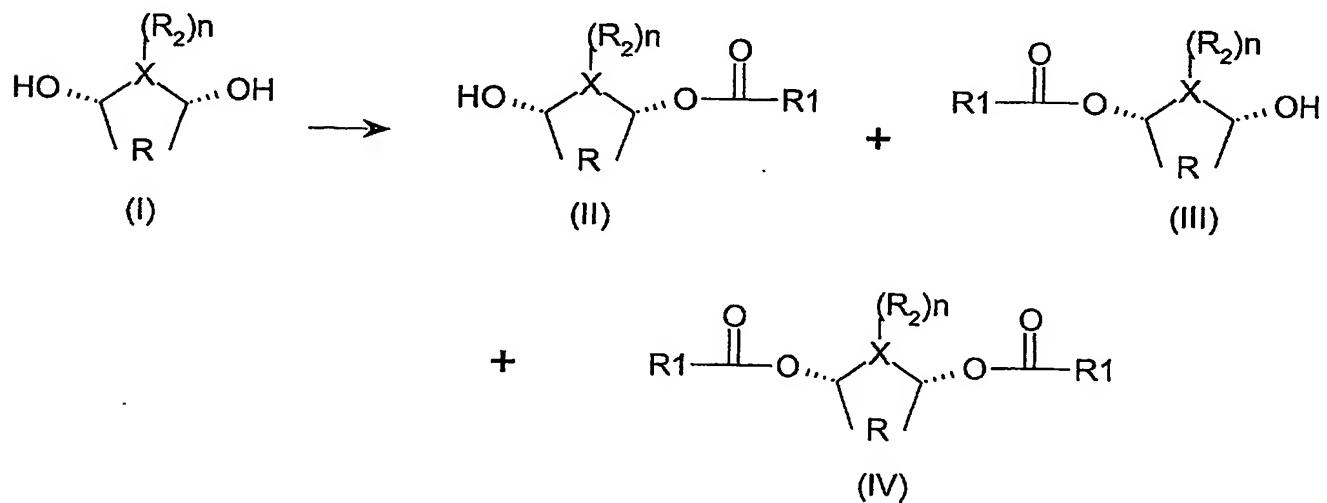
Toutefois, les autorités nationales réglementaires souhaitent à terme éliminer l'utilisation de produits d'origine animale pour la fabrication de médicaments et des produits pharmaceutiques, pour des raisons de sécurités médicales. Il existe donc un besoin de développer des procédés de fabrication d'intermédiaires 30 chiraux pharmaceutiques en utilisant des enzymes qui ne sont pas d'origine animale.

Par ailleurs, il existe également un besoin de mettre en évidence des enzymes efficaces, notamment à de faibles quantités, permettant d'obtenir une bonne sélectivité des synthons chiraux souhaités.

Il existe dans l'art antérieur des procédés de fabrication de synthons chiraux énantiomériquement purs utilisant des enzymes d'origines végétales ou microbiennes. Toutefois, la plupart de ces procédés décrits sont difficilement transposables à l'échelle industrielle. Il est donc très intéressant de disposer d'un procédé industriel permettant d'accéder aux synthons chiraux énantiomériquement purs souhaités.

10 La présente invention concerne un nouveau procédé de fabrication de synthons chiraux comprenant un groupement hydroxyle libre et un groupement hydroxyle protégé par une fonction ester, en utilisant une lipase provenant des bactéries Gram-négatif *Alcaligenes spp.*

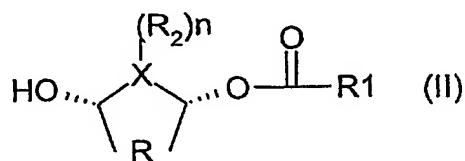
Le procédé de fabrication consiste en une transestérification enzymatique d'un 15 composé diol par une lipase et un agent d'acylation, par exemple, de la manière suivante :



20 L'utilisation de la lipase permet ainsi d'obtenir une réaction de transestérification du composé (I) avec des performances supérieures à celles obtenues avec une enzyme d'origine animale, avec des quantités nettement plus faibles.

A partir du composé de formule (II) de l'invention il est possible de fabriquer des médicaments et produits pharmaceutiques en utilisant ce composé comme intermédiaire.

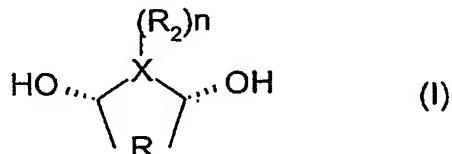
La présente invention a pour premier objet un procédé pour la fabrication d'un 5 composé de formule (II) :



dans lequel :

- R est une liaison covalente ou une chaîne hydrocarbonée comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; préférentiellement de 1 à 5 atomes de carbone ;
- 10. - R<sup>1</sup> est un groupe hydrocarboné comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; préférentiellement de 1 à 6 atomes de carbone ;
- R<sup>2</sup> correspond à un atome d'hydrogène ; n est un nombre entier compris entre 0 et 2, c'est à dire 0, 1 ou 2 ;
- X est un atome choisi dans le groupe comprenant : le carbone, l'azote, l'oxygène, et le soufre, préférentiellement le carbone ;
- 15. comprenant au moins les étapes suivantes :

a) on fait réagir un composé de formule (I) :



avec un agent d'acylation dans un solvant organique en présence d'une lipase de la classe EC 3.1.1.3 du genre (genus) *Alcaligenes spp*, de façon à former le 20. composé de formule (II) ;

b) on isole le composé de formule (II).

La présente invention a également pour objet un composé de formule (II) susceptible d'être obtenu par le procédé tel que décrit précédemment. La

présente invention a aussi pour objet une composition susceptible d'être obtenue par le procédé tel que décrit précédemment.

Les lipases utilisées selon l'invention sont des lipases de la classe EC 3.1.1.3 du genre (genus) *Alcaligenes spp*. Le genre *Alcaligenes spp*, de la famille 5 *Alcaligenacae* comprend plusieurs espèces, telles que par exemple : *Alcaligenes aestus*, *Alcaligenes aquamarinus*, *Alcaligenes cupidus*, *Alcaligenes defragrans*, *Alcaligenes denitrificans*, *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes faecalis*, *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes pacificus*, *Alcaligenes paradoxus*, *Alcaligenes piechaudii*, *Alcaligenes ruhlandii*, *Alcaligenes venustus*, *Alcaligenes xylosoxidans*.

10 On peut utiliser selon le procédé de l'invention différentes lipases conformes à l'invention.

Les lipases de l'invention peuvent être obtenues à partir de culture d'*Alcaligenes spp*. Les conditions de culture peuvent varier en fonction du type de souche utilisées. Il est recommandé de choisir ces conditions de façon à produire les 15 lipases de la manière la plus avantageuse possible. La température de culture est généralement comprise entre 5 et 50°C. La période de culture est généralement comprise entre 1 et 10 jours.

La récupération des lipases d'*Alcaligenes spp* peut être réalisée de différentes manières bien connues de l'homme du métier. Il est par exemple possible de 20 procéder à une séparation des bactéries et du milieu de culture, notamment par centrifugation ou filtration, et ensuite procéder à une purification des lipases. Par exemple, la purification des lipases peut être réalisée par précipitation, lyophilisation, chromatographie échangeuse d'ions, immuno-affinité à l'aide d'anticorps mono- ou polyclonaux spécifiques, et/ou dialyse. On peut également 25 recueillir les lipases d'*Alcaligenes spp* par destruction des bactéries, par exemple par sonication et récupération du broyat, ou par une lyse enzymatique des parois cellulaires. Les lipases de l'invention peuvent notamment être purifiées à partir des souches d'*Alcaligenes spp* par ajout de sels, en utilisant par exemple du sulfate d'ammonium, passage dans une chromatographie échangeuse d'ions et 30 ensuite filtration sur gel.

Il est bien entendu que des lipases naturelles, synthétiques mutées, chimériques et/ou recombinantes provenant d'*Alcaligenes spp* peuvent être utilisées dans le

procédé selon l'invention, dans la mesure ou leur activité de transestérification vis à vis des substrats de l'invention est conservée, voir améliorée. Ainsi, des lipases mutées d'*Alcaligenes spp* exprimées par d'autres micro-organismes ou produites par synthèse chimique sont également concernées par la présente invention.

5 Préférentiellement, les lipases d'*Alcaligenes spp* utilisées selon l'invention permettent d'obtenir les paramètres suivants :

- Excès énantiomérique en composé (II) supérieur ou égal à 50 %, préférentiellement supérieur ou égal à 70 %, particulièrement supérieur ou égal à 90 % ; tout particulièrement supérieur ou égal à 100 %.
- 10 - Sélectivité en composés (II) et (III) supérieure ou égale à 2, préférentiellement supérieure ou égale à 2,5, particulièrement supérieure ou égale à 3,3 ;
- Rendement en composé (II) supérieur ou égal à 40 %, préférentiellement supérieur ou égal à 50 % ; particulièrement supérieure ou égale à 75 % ; et
- 15 - Taux de transformation ou conversion du composé (I) supérieur ou égal à 70 %, préférentiellement supérieur ou égal à 90 %, particulièrement supérieur ou égal à 95 %.

Pour déterminer ces paramètres, on peut procéder au test suivant : dans un réacteur de 100 mL, on introduit sous agitation 4,21 g (0,0421 mol) de 1,3-20 dihydroxycyclopent-2-ène (correspondant au composé (I)), ci-après appelé diol, dans 30 mL d'acétone (23,7 g) à température ambiante (24-25 °C). Après solubilisation du 1,3-dihydroxycyclopent-2-ène dans l'acétone, on ajoute 18,08 g (0,215 mol; 5 équivalents molaires par rapport au diol) d'acétate de vinyle, puis 420 µL (10 % en poids par rapport au diol) d'eau déminéralisée. La température 25 du milieu est alors fixée à 5°C. On ajoute 5 % en poids d'enzyme lipase de la classe EC 3.1.1.3 d'*Alcaligenes spp* par rapport au diol. Au bout de 12 heures, on effectue un prélèvement de 0,5 mL de milieu réactionnel que l'on centrifuge. 200 µL sont prélevés et dilués dans 800 µL d'acétone avant injection en chromatographie en phase gazeuse chirale. On mesure ensuite les 30 caractéristiques mentionnées précédemment comme expliqué dans la partie expérimentale.

Ce test permet à l'homme du métier de déterminer les lipases de la classe EC 3.1.1.3, provenant du genre *Alcaligenes spp* et/ou leurs fragments qui ont une activité conforme à l'invention.

Préférentiellement, les lipases utilisées selon le procédé de l'invention présentent 5 une séquence d'acides aminés ayant un pourcentage d'homologie supérieur ou égal à 80 %, notamment 90 %, de préférence 95, plus préférentiellement 100 % avec la séquence d'acides aminés de la lipase QL d'*Alcaligenes sp* PL-266, enregistrées sous le numéro FERM-P N°3187, la protéine ayant une activité de transestérification sur les substrats de l'invention. Les lipases utilisées selon le 10 l'invention peuvent provenir de séquences nucléotidiques présentant un pourcentage d'homologie supérieur ou égal à 80 %, notamment 90 %, de préférence 95, plus préférentiellement 100 % avec la séquence nucléotidique du gène de la lipase QL d'*Alcaligenes sp* PL-266, enregistrées sous le numéro FERM-P N°3187, la lipase obtenue ayant une activité de transestérification sur 15 les substrats de l'invention.

Il est entendu que le terme homologie se réfère à la ressemblance parfaite ou identité entre les acides aminés comparés mais aussi à la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Les séquence d'acides aminés peuvent différer de la séquence de référence par substitution, délétion et/ou insertion d'un 20 ou de plusieurs acides aminés, de préférence d'un nombre réduit d'acides aminés, notamment par substitution d'acides aminés naturels par des acides aminés non naturels ou pseudo-acides aminés, à des positions telles que ces modifications ne portent pas significativement atteinte à l'activité biologique de la protéine. L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel 25 d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705 ; ou BLAST software du National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medecine, 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894).  
30 Les séquences d'acides aminés des lipases naturelles, synthétiques mutées, chimériques et/ou recombinantes peuvent être de la même longueur que les séquences de référence.

Il en entendu selon l'invention que les lipases de la classe EC 3.1.1.3 peuvent provenir des bactéries du genre d'*Alcaligenes spp*. Toutefois, par exemple dans le cadre de procédé industriel de fabrication de ces lipases, il est possible que celles-ci soient produite par des cellules hôtes ou par des processus chimiques.

5 Les séquences nucléotidiques conduisant à la synthèse des lipases naturelles, synthétiques mutées, chimériques et/ou recombinantes peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent 10 être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation ou la transformation au chloride de calcium, polyéthylène glycol ou la fusion de protoplastes. Les signaux contrôlant l'expression, ou la sur-expression, des séquences nucléotidiques (promoteurs, activateurs, séquences de terminaison...) sont choisis en fonction de l'hôte 15 cellulaire utilisé. Les cellules hôtes peuvent être transfectées de manière transitoire ou stable, par ces vecteurs d'expression. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes, procaryotes ou eucaryotes. Des exemples de cellules hôtes incluent notamment des cellules de mammifères, telles que les cellules 293, CMV (cellule de cytomegalovirus), des cellules 20 d'insectes telles que les cellules dérivées d'ovaire de *Spodoptera frugiperda* ou cellules d'embryons de *Drosophila melanogaster*, des bactéries telles que *E. coli*, *B. subtilis* et des souches de levures telles que *Saccharomyces cerevisiae*.

Les lipases de l'invention peuvent également être produites par synthèse chimique. A cet effet, on peut recourir à n'importe quelle méthode bien connue de l'homme du métier. Le peptide de l'invention peut par exemple être synthétisé par les techniques de la chimie de synthèse, telles que la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse pour des raisons de pureté, de spécificité antigénique, d'absence de produits secondaires non désirés et pour sa facilité de production. La synthèse chimique permet notamment de produire des séquences nucléotidiques ou d'acides aminés, comportant éventuellement des substitutions, délétions et/ou insertions par rapport à une séquence de référence.

On peut encore utiliser directement dans le procédé, des cellules entières d'*Alcaligenes spp*, éventuellement recombinées de manière à sur-exprimer les lipases à un niveau satisfaisant. A cet effet, on peut insérer dans le génome du micro-organisme une ou plusieurs cassettes d'expression contenant la séquence 5 nucléotidique exprimant les lipases de l'invention, sous la dépendance d'un ou des élément(s) permettant son expression ou la régulation de son expression, tels que notamment des promoteurs, activateurs et/ou terminateurs de transcription.

A titre d'exemple, on peut notamment utiliser la lipase QL d'*Alcaligenes sp* PL-10 266, enregistrée sous le numéro FERM-P N°3187 (également appelé QLM) mentionnée par exemple dans le brevet JP 58-36953, ou la lipase PL d'*Alcaligenes sp* PL-679, enregistrée sous le numéro FERM-P N°3783, mais également ATCC 31371 et DSM 1239, mentionnée par exemple dans le brevet JP 60-15312.

15 La lipase peut être immobilisée sur un support solide approprié ou non immobilisée. Le support solide peut être choisi dans le groupe comprenant : le DEAE cellulose, le DEAE sepharose, la diatomée, la silice, l'alumine, le polypropylène et/ou leurs mélanges.

Comme lipases de la classe EC 3.1.1.3 d'*Alcaligenes spp*, on peut notamment 20 utiliser la Chirazyme<sup>TM</sup> L-10 commercialisée par la société Roche ou les lipases QL (ou QLM), QLC, QLG, PL, PLC et PLG commercialisées par la société Meito-Sangyo. Les lipases PLC et PLG correspondent respectivement à la lipase PL immobilisée sur diatomée et sur granulés de terres de diatomée. Les lipases QLC et QLG correspondent respectivement à la lipase QL immobilisée sur diatomée et 25 sur granulés de terres de diatomée.

De nombreux substrats de formule (I) peuvent être monoacylés selon le procédé de la présente invention.

Le groupement R peut être une liaison covalente ou une chaîne hydrocarbonée 30 comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, préférentiellement de 1 à 5 atomes de carbone, saturée ou insaturée, linéaire ou branchée, aliphatique, cyclique et/ou aromatique, pouvant comprendre et/ou former un ou plusieurs cycles, éventuellement aromatique. Cette chaîne hydrocarbonée peut éventuellement

comprendre un ou plusieurs hétéroatomes choisi(s) dans le groupe comprenant le carbone, l'azote, le phosphore, l'oxygène, le silicium et le soufre.

Si R est une liaison covalente, le composé de formule (I) sera un composé dérivé du cyclopropane.

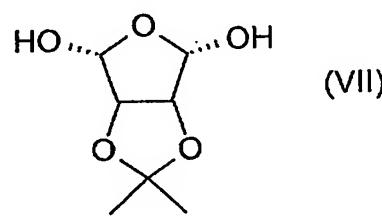
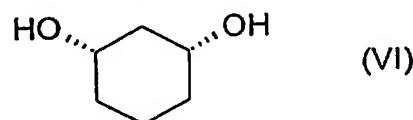
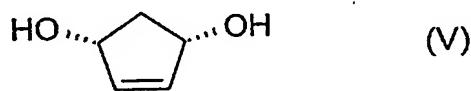
5 Préférentiellement, R est une chaîne hydrocarbonée comprenant au moins une insaturation. R peut être une chaîne hydrocarbonée comprenant un ou plusieurs cycle(s) aromatique(s) ou non-aromatique(s).

Par exemple, si le composé de formule (I) est le cis-4-cyclopentene-1,3-diol, le groupement R correspond à une chaîne hydrocarbonée insaturée comprenant 2

10 atomes de carbone.

Le groupement  $R^2n$  est dépendant de la valence de l'atome X. Par exemple, si X est l'atome de carbone,  $R^2=H$  et  $n=2$ . Si X est l'atome d'oxygène ou de soufre,  $R^2=H$  et  $n=0$ . De même si X est un atome d'azote,  $R^2=H$  et  $n=1$ .

15 Préférentiellement, le composé de formule (I) est choisi dans le groupe comprenant choisi dans le groupe comprenant les composés de formule (V), (VI) et/ou (VII) :



20 Le substrat préféré selon l'invention est le cis-4-cyclopentene-1,3-diol. Le composé de formule (II) obtenu à partir de ce substrat selon le procédé de l'invention est le (1R, 4S)-4-acétoxy-cyclopent-2-én-1-ol.

La lipase isolée peut être employée en solution aqueuse, éventuellement tamponnée, dans des solvants organiques, en solution mono-phasique ou biphasique.

Différents types de solvants organiques peuvent être utilisés selon la présente invention. Le solvant organique peut être un composé hydrocarboné aliphatique, cyclique ou aromatique, comprenant éventuellement des fonctions chlorés, azotés, acides, cétone, aldéhyde et/ou ester.

Le solvant organique est préférentiellement choisi dans le groupe comprenant : l'acétone, la méthyléthylcétone, le tertiobutyle méthyle éther (TMBE), le tétrahydrofurane (THF), l'acétonitrile, la cyclohexanone, la cyclopentanone, le toluène, et la méthylisobutylcétone.

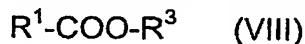
Préférentiellement, le solvant est compatible avec la lipase de l'invention, c'est à dire qu'il ne dégrade pas la protéine et/ou qu'il ne diminue pas son activité biologique vis à vis du procédé de l'invention de plus de 30 %, mesuré par exemple par rapport au rendement, l'excès énantiomérique en composé (II), le taux de transformation ou conversion du composé (I) et/ou la sélectivité.

Outre le solvant organique, le milieu réactionnel, notamment celui de l'étape a), peut comprendre de l'eau, par exemple de 0,1 et 30 % en poids d'eau par rapport au poids du composé de formule (I), préférentiellement de 5 à 20 % en poids d'eau.

On entend par agent d'acylation, un composé capable de réagir avec une fonction hydroxyle du composé (I) de façon à protéger celui-ci par l'intermédiaire d'une fonction ester.

L'agent d'acylation peut être un ester, un anhydre ou un carbonate.

25 L'agent d'acylation peut être un composé de formule (VIII) :



dans laquelle :

- $R^1$  est défini précédemment ; et
- $R^3$  est un groupe hydrocarboné comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, éventuellement linéaire, cyclique, aromatique, ramifié, saturé et/ou insaturé ; et comprenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, tel que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou le chlore.  $R^3$  est de préférence un groupe

alkyle comprenant de 1 à 6 atomes de carbone, éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes de fluor, ou un groupe alcényle comprenant de 2 à 6 atomes de carbone.

R<sup>1</sup> peut être un groupe hydrocarboné comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ; 5 préférentiellement de 1 à 6 atomes de carbone ; éventuellement linéaire, cyclique, aromatique et/ou ramifié et comprenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, tel que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou le chlore. R<sup>1</sup> peut être choisi dans le groupe comprenant le méthyle, l'éthyle, le propyle, le phényle et l'isopropyle.

10 Cet agent d'acylation peut être choisi dans le groupe comprenant : les acétates, les benzoates et les isobutyrates.

L'agent d'acylation est préférentiellement choisi dans le groupe comprenant : l'acétate de vinyle, l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isopropyle, l'acétate de 2,2,2-trifluoroéthyle, et l'acétate d'isopropényle.

15 L'agent d'acylation peut également être utilisé comme solvant organique. Selon le procédé de l'invention, la proportion d'agent d'acylation est préférentiellement supérieur à 1 mole équivalent par rapport composé de formule (I), plus préférentiellement compris entre 1 et 10 moles équivalent.

20 Le milieu réactionnel peut être obtenu par mélange du composé de formule (I), et éventuellement l'agent d'acylation au solvant, et ensuite ajout de la lipase de l'invention. On peut également obtenir le milieu réactionnel par ajout successifs des produits suivants : composé de formule (I), lipase, solvant et enfin ajout de l'agent d'acylation.

25 Selon le procédé de l'invention, la proportion de lipase peut être comprise entre 0,1 à 30 % en poids par rapport au poids du composé de formule (I), préférentiellement de 0,1 à 20 % en poids, particulièrement de 0,5 à 10 % en poids.

La réaction de catalyse enzymatique de l'étape a) s'effectue préférentiellement à une température comprise entre -5 et 40 °C, préférentiellement entre 1 et 15 °C.

30 Pour chaque substrat, il est possible de déterminer à l'avance et/ou de contrôler en continu la durée de la réaction enzymatique, en fonction du composé de formule (I) utilisé. Un homme du métier est parfaitement à même de déterminer

facilement les conditions de durée optimales pour un substrat donné. Ceci peut être réalisé en réalisant des prélèvements réguliers du milieu réactionnel sur lesquels on évalue l'évolution de l'excès énantiomérique et le taux de conversion. La durée de la réaction enzymatique de l'étape a) est généralement comprise

5 entre 1 et 24 heures, préférentiellement entre 4 et 16 heures.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un composé de formule (II) obtenu par un procédé de fabrication tel que défini précédemment, en tant qu'intermédiaire, pour la fabrication d'un médicament ou d'un produit pharmaceutique, tel que prostaglandines, des prostacyclines et/ou des

10 thromboxanes. A partir du composé de formule (II) de l'invention il est possible de fabriquer des médicaments et produits pharmaceutiques en utilisant ce composé comme intermédiaire. Ainsi, par exemple, l'utilisation du (1R, 4S)-4-acétoxy-cyclopent-2-ène-1-ol, correspondant à un composé de formule générale (II) est utilisé pour la synthèse de produits pharmaceutiques, comme mentionné dans le

15 brevet WO9526729 et les publications suivantes : J. Stjenschantz et al. Drugs of the Future, 1992, 17, 691 ; Noyori et al. Angew. Chem. Int. Ed., 1984, 23, 847 ; Kaumen et al. J. Chem. Soc., Chem. Comm., 1986, 1298 ; Kondo et al. Angew. Chem. Int. Ed., 1975, 14, 103 ; Tömösközi et al. Tetrahedron Lett., 1976, 4639.

20 On donne ci-après des exemples de réalisation pratique de l'invention. Les exemples suivent illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

#### Exemple 1 :

##### Matériaux utilisés :

- Lipase d'*Alcaligenes* sp. : GLG, QLC ou QL commercialisées par la société Meito-Sangyo ; ou Chirazyme L10<sup>TM</sup> commercialisée par la société Roche (ci-après appelé L10) ;
- Lipase Pancréatine : Pancréatine de porc commercialisée par la société Sigma ;
- Substrat diol : cis-4-cyclopentene-1,3-diol commercialisé par la société Fluka (composé de formule (I)).

Dans un réacteur de 100 mL, on introduit sous agitation 4,21 g (0,042 mol) de 1,3-dihydroxycyclopent-2-ène dans 30 mL d'acétone (23,7 g) à température

ambiante (24-25 °C). Après solubilisation du diol dans l'acétone, on ajoute 18,08 g d'acétate de vinyle (0,21 mol; 5 équivalents molaires par rapport au diol) puis 420 µL (10 % en poids par rapport au diol) d'eau déminéralisée. La température du milieu est alors fixée à 5°C.

5 On ajoute 100 % en poids d'enzyme Pancréatine par rapport au diol ou un pourcentage en poids déterminé d'enzyme lipase *d'Alcaligenes sp* par rapport au diol. Au bout de 6,5 heures, on effectue un prélèvement de 0,5 mL de milieu réactionnel que l'on centrifuge. 200 µL sont prélevés et dilués dans 800 µL d'acétone avant injection en chromatographie en phase gazeuse chirale.

10 La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est réalisée à l'aide d'une colonne Cyclodex B composée de  $\beta$ -cyclodextrine perméthylée déposée dans une huile silicone constituée à 86% de motifs diméthylsiloxane et de 14% de motifs méthyl-cyanopropylsiloxane. La colonne possède une longueur de 30 m, un diamètre interne de 250 µm et une épaisseur de film d'huile silicone de 0,25 µm. Le diol (composé (I)) est élué avec un temps de rétention relatif de 1,00, le monoacétate R (composé (III)) de 1,10, le monoacétate S (composé (II)) de 1,13 et le diacétate composé (IV) de 1,38.

15

On mesure ensuite le pourcentage surface des pics extraits de la chromatographie pour les composés (I), (II), (III) et (IV). Les résultats sont 20 mentionnés dans le tableau I :

Tableau I

	Pan-creatine	QLG	QLG	QLG	QLG	QLC	QL	L10
Taux de transformation ou conversion du composé (I) (%)	20	78,9	88,6	93,5	98,5	98,7	99	99
Excès énantiomérique en composé (II) (%)	67	80	74	87	94	94	97	97
Sélectivité	10,3	7,1	5,6	4,8	3,9	3,9	3,3	3,5
Rendement en composé (II) (%)	16,5	61,9	69,1	72,5	75,8	76,4	75,5	76,4
Temps de réaction (heures)	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Quantité d'enzyme (en % poids par rapport au diol)	100	3,6	5,3	7,0	10,0	10,0	5,0	5,0

Le taux de transformation ou conversion du composé (I) (%) est calculé de la manière suivante : (pourcentage surface du composé (I) au temps 0 (début de la réaction) – le pourcentage surface du composé (I) en fin de réaction) / pourcentage surface du composé (I) au temps 0.

L'excès énantiomérique en composé (II) (%) est calculé de la manière suivante : (valeur absolue du (pourcentage surface du composé (II) – pourcentage surface

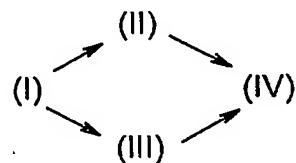
de composé (III))) / (pourcentage surface du composé (II) + pourcentage surface de composé (III)).

La sélectivité est calculée de la manière suivante : Il correspond au (pourcentage surface des composés (II) + (III)) / (pourcentage surface du composé (IV)).

5 Le rendement en composé (II) (%) est calculé de la manière suivante : (pourcentage surface du composé (II)) / (pourcentage surface du composé (I) au temps 0).

On observe ainsi que l'utilisation de la lipase permet d'obtenir une réaction de transestérification du diol pour obtenir un composé (II) avec des performances supérieures à celles obtenues avec une enzyme d'origine animale, avec des quantités nettement plus faibles.

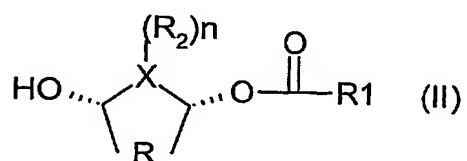
10 Comme il se produit un schéma réactionnel du type :



15 la faible quantité de composé (IV) obtenue en fin de réaction en utilisant l'enzyme pancréatine entraîne une mesure de sélectivité importante.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la fabrication d'un composé de formule (II) :



5 dans lequel :

-  $\text{R}$  est une liaison covalente ou une chaîne hydrocarbonée comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ;

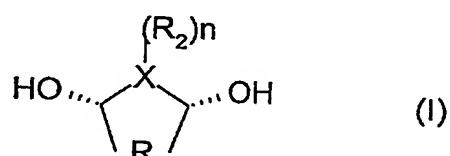
-  $\text{R}^1$  est un groupe hydrocarboné comprenant de 1 à 10 atomes de carbone ;

-  $\text{R}^2$  correspond à un atome d'hydrogène ;  $n$  est un nombre entier compris entre 0 et 2 ;

-  $\text{X}$  est un atome choisi dans le groupe comprenant le carbone, l'azote, l'oxygène, et le soufre ;

comprenant au moins les étapes suivantes :

a) on fait réagir un composé de formule (I) :



15 avec un agent d'acylation dans un solvant organique en présence d'une lipase de la classe EC 3.1.1.3 d'*Alcaligenes spp*, de façon à former le composé de formule (II) ;

b) on isole le composé de formule (II).

20 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la lipase de la classe EC 3.1.1.3 présentent les caractéristiques suivantes :

- Excès énantiomérique en composé (II) supérieur ou égal à 50 % ;
- Sélectivité en composés (II) et (III) supérieure ou égale à 2 ;
- Rendement en composé (II) supérieur ou égal à 40 % ; et

- Taux de transformation ou conversion du composé (I) supérieur ou égal à 70 %.

3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que la lipase est choisie dans le groupe comprenant : la lipase QL d'*Alcaligenes sp* PL-266, enregistrées sous le numéro FERM-P N°3187, et la lipase PL d'*Alcaligenes sp* PL-679, enregistrées sous le numéro FERM-P N°3783.

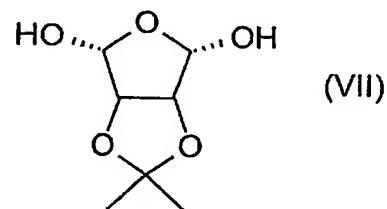
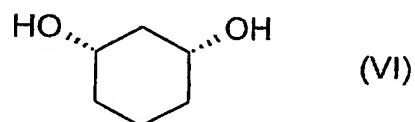
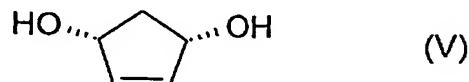
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la lipase est immobilisée sur un support solide approprié ou non immobilisée.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le support solide est choisi dans le groupe comprenant : le DEAE cellulose, le DEAE sepharose, la diatomée, la silice, l'alumine, le polypropylène et/ou leurs mélanges.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la lipase est choisie dans le groupe comprenant : les lipases QL, QLC, QLG, PL, PLC et PLG.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que R est une chaîne hydrocarbonée comprenant au moins une insaturation.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le composé de formule (I) est choisi dans le groupe comprenant les composés de formule (V), (VI) et/ou (VII) :



5 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la proportion de lipase est comprise entre 0,1 à 30 % en poids par rapport au poids du composé de formule (I).

10 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le solvant organique est choisi dans le groupe comprenant : l'acétone, la méthyléthylcétone, le tertiobutyle méthyle éther (TMBE), le tétrahydrofurane (THF), l'acétonitrile, la cyclohexanone, la cyclopentanone, le toluène, et la méthylisobutylcétone.

15 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le milieu réactionnel de l'étape a) comprend de l'eau.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'agent d'acylation est un composé de formule (VIII) :

20  $R^1-COO-R^3$  (VIII)

dans laquelle :

- $R^1$  est défini précédemment ; et

- $R^2$  est un groupe hydrocarboné comprenant de 1 à 10 atomes de carbone.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que l'agent d'acylation est choisi dans le groupe comprenant : les acétates, les 5 benzoates et les isobutyrates.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que l'agent d'acylation est choisi dans le groupe comprenant : l'acétate de vinyle, l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isopropyle, l'acétate de 2,2,2-trifluoroéthyle, et 10 l'acétate d'isopropényle.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que la réaction de l'étape a) s'effectue à une température comprise entre -5 et 40 °C.

15 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que la durée de la réaction enzymatique de l'étape a) est comprise entre 1 et 24 heures.



## DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

## BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété Intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*02

## DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)	R 03137	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0312329	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) Procédé de fabrication de composé comprenant un groupement hydroxyle libre et un groupement hydroxyle protégé par une fonction ester par réaction enzymatique		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> RHODIA CHIMIE 26, quai Alphonse Le Gallo F-92512 BOULOGNE BILLANCOURT Cedex		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).		
Nom		GAREL
Prénoms		Laurent
Adresse	Rue	16, rue des Tuiliers
	Code postal et ville	69003 LYON
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		GELO-PUJIC
Prénoms		Mirjana
Adresse	Rue	15, rue Carnot
	Code postal et ville	69190 SAINT-FONS
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		SCHLAMA
Prénoms		Thierry
Adresse	Rue	20, chemin de Parsonge
	Code postal et ville	69570 DARDILLY
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Jean-Pierre ESSON 		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

**BLACK BORDERS**

**IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

**FADED TEXT OR DRAWING**

**BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

**SKEWED/SLANTED IMAGES**

**COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

**GRAY SCALE DOCUMENTS**

**LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

**REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

**OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**